

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業))
分担研究報告書

アスピリン不耐症喘息患者における難治性鼻茸の網羅的蛋白解析と機能解析

研究分担者 藤 枝 重 治 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授
研究協力者 鈴木 弟 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 病院助教
田 中 幸 枝 福井大学医学部分子生命化学 助手
春 名 眞 一 獨協医科大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授
月 館 利 治 獨協医科大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教

研究要旨：

アスピリン不耐症喘息(AIA)の機序は不明な点が多い。またアスピリン不耐症喘息患者には鼻茸の合併が多く、かつ難治性である。われわれはアスピリン不耐症患者と慢性副鼻腔炎患者のそれぞれの鼻茸について、プロテオーム解析を行い、AIA 鼻茸において L-plastin の発現がアスピリン耐性喘息(ATA)鼻茸に比べ増加し、その発現は主に好酸球であることを見出した。また、L-plastin 陽性細胞を AIA 鼻茸組織と ATA 鼻茸組織で比較すると、有意に AIA 群で増加しており、これまでアスピリン負荷試験などリスクを伴う診断法以外の鑑別方法として有用であることが示唆された。L-plastin の好酸球における機能は、好酸球細胞株 EoL-1 細胞を用いて検討した。その結果 L-plastin は、好酸球の遊走、生存に関連し、CysLT1R の発現亢進に関与していた。これらより、L-plastin は AIA において重要な役割を担い、診断や治療に有用である可能性が示唆された。

A．研究目的

アスピリン不耐症喘息(AIA)患者における鼻茸の難治性・再発性の解明のために、我々はこれまで網羅的蛋白解析(プロテオーム解析)を行ってきた。その結果、アスピリン耐性喘息(ATA)と比較し AIA 群で有意に発現が亢進している蛋白と発現が減少している蛋白が判明した。その中で、AIA 群において有意に発現亢進している蛋白で、浸潤好酸球に発現している L-plastin に着目した。前年までの研究では、好酸球細胞株 EoL-1 における L-plastin の発現変化を、好酸球生存等に重要なサイトカイン、LPS 刺激にて検討した。今年度は L-plastin の好酸球における役割及びアスピリン喘息との関係を検討した。

B．研究方法

1) 好酸球細胞株 EoL-1 細胞の生存率測定：
EoL-1 細胞に L-plastin と negative control に対する siRNA を各々トランスフェクションし

た。トランスフェクション 1 日目、2 日目、3 日目でトリパンブルー染色し各々の生存率を計測した。細胞数計測には、Countess™ Automated Cell Counter を使用した。

2) 好酸球細胞株 EoL-1 細胞の遊走能測定：
CytoSelect™ 24-well Cell Migration (3 μm), Fluorometric を用いて、L-plastin と negative control の siRNA をトランスフェクションした各々の EoL-1 細胞の細胞遊走能を検討した。遊走刺激因子として、GM-CSF : 0、10、100、1000ng/ml で刺激した。

3) 好酸球細胞株 EoL-1 細胞における CysLT1R の発現：
EoL-1 細胞に L-plastin 及び negative control の siRNA を各々トランスフェクションし、リアルタイム PCR を用いてシステニルロイコトリエン 1 受容体 (CysLT1R) mRNA の発現変化を測定した。

(倫理面への配慮)

「慢性好酸球性炎症疾患の網羅的遺伝子解析と網羅的蛋白に関する研究」,「慢性副鼻腔炎に関する疫学的調査と遺伝子解析研究」の題名で福井大学医学部倫理委員会の承認を受け、本研究を行った。また、データシート作成は、個人を同定できる情報を削り、代わりに符号をつけて区別管理した。

C . 研究結果

1)L-plastin に対する siRNA をトランスフェクションした EoL-1 細胞は、negative control の siRNA 導入した細胞群より、導入 2 日目で生存率が低かった。

2) L-plastin の siRNA 導入により、EoL-1 細胞の GM-CSF 刺激による遊走能は低下した。しかし、GM-CSF1000ng/ml の高濃度刺激では遊走能に差が認められなかった。

3) L-plastin の siRNA 導入により、EoL-1 細胞における CysLT1R mRNA の発現が低下した。

D . 考察

これまでの我々の研究で、AIA 鼻茸では ATA 鼻茸や慢性副鼻腔炎鼻茸に比べ、L-plastin の陽性細胞数が有意差に増加していた。このことは、L-plastin が AIA と ATA の鑑別に有用であることを示しており、また重要な役割を担っていると考えられる。細胞の二重染色では、L-plastin は好酸球細胞の細胞質に局在していた。以上から、L-plastin は好酸球の機能と関連している可能性が考えられた。

好酸球細胞株 EoL-1 細胞において L-plastin の発現低下とともに、好酸球細胞株の生存率及び遊走能も低下した。このことは、AIA においては、L-plastin の発現が亢進していること

で、好酸球の局所への遊走及び生存を促し、好酸球炎症を惹起していると考えられる。これに加え、L-plastin と好酸球 CysLT1R の発現も関連あることが示された。これまでの報告で、CysLT1R は AIA と深く関連が示されており、L-plastin はこの点からも AIA にとって重要な役割を担っていると考えられる。また、前回の検討で、好酸球細胞株にアスピリンで刺激すると LTC₄ の発現が亢進することがわかった。AIA においては、L-plastin 発現亢進することによって、生存延長し、CysLT1R の発現が亢進した好酸球が局所へ遊走され、自身がアスピリン刺激により産生したロイコトリエンで負の循環に陥っていることが、AIA 発症や AIA 鼻茸が難治性である原因の一つではないかと考えられた。これらより、L-plastin は AIA の診断と治療にも結び付く可能性が示唆された。

E . 結論

好酸球における L-plastin の発現亢進は、好酸球の生存・遊走に重要な役割を担い、なおかつ CysLT1R の発現を亢進させることにより、AIA 発症及び AIA 鼻茸の生成・難治性に関与している可能性を見出した。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

1) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Suh LA, Carter R, Norton J, Grammer LC, Tan BK, Chandra RK, Conley DB, Kern RC, Fujieda S, Schleimer RP.: Glandular mast cells with distinct phenotype are highly elevated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. J Allergy Clin Immunol. 2012

Aug;130(2):410-20.e5.

2) Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M.:

Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. Nat Genet. 2012 Oct 7;44(11):1222-6.

3) Yamada T, Yamamoto H, Kubo S, Sakashita M, Tokunaga T, Susuki D, Narita N, Ogi K, Kanno M, Yamashita S, Terasawa Y, Kayano Y, Masada M, Fujieda S.: Efficacy of mometasone furoate nasal spray for nasal symptoms, quality of life, rhinitis-disturbed sleep, and nasal nitric oxide in patients with perennial allergic rhinitis. Allergy Asthma Proc. 2012 Mar-Apr;33(2):e9-16.

4) Fujieda S, Kurono Y, Okubo K, Ichimura K, Enomoto T, Kawauchi H, Masuyama K, Goto M, Suzaki H, Okamoto Y, Takenaka H. : Examination, diagnosis and classification for Japanese allergic rhinitis: Japanese guideline. Auris Nasus Larynx. 2012 Dec;39(6):553-6. Epub 2012 Mar 7.

2 . 学会発表

1) Susuki D, Tanaka Y, Ito Y, Yamada T, Nomi N, Kodama S, Suzuki M, Tsukidate T, Haruna S, Fujieda S. Proteomics analysis of nasal polyps in aspirin intolerant asthma (AIA) and chronic rhinosinusitis (CRS). The 14th Japan-Korea Joint Meeting of

Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, April, 13 , 2012, Kyoto.

2) Fujieda S. Susuki D, Tanaka Y, Tsukidate T, Haruna S, Yamada T. Proteomics analysis of nasal polyps from patients with aspirin intolerant asthma (AIA). Collegium oto-rhino-laryngologicum micitiae sacrum. August 27,2012, Roma.

3) 鈴木 弟 : アスピリン不耐症患者と慢性副鼻腔炎患者における鼻茸の相違・網羅的蛋白解析による検討・第 51 回日本鼻科学会総会・学術講演会 シンポジウム 千葉市 2012 . 9.28 . 千葉

H . 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし